

RNAi 介导的棉铃虫氨肽酶 N 基因 *Haapn1* 和钙粘蛋白基因 *Ha_BtR* 沉默对 Cry1Ac 毒力的影响

周慧丹, 杨亦桦, 吴益东*

(南京农业大学植物保护学院, 农业部作物病虫害监测与防控重点开放实验室, 南京 210095)

摘要: 氨肽酶 N (aminopeptidase N, APN) 和钙粘蛋白 (cadherin) 是存在于鳞翅目昆虫中肠刷状缘膜囊 (brush border membrane vesicles, BBMV) 上 Bt 毒素 Cry1A 的受体。本实验将棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 氨肽酶 N1 基因 *Haapn1* 和钙粘蛋白基因 *Ha_BtR* 双链 RNA (dsRNA) 注入棉铃虫 4 龄幼虫体内, 以研究这两种受体基因沉默后对 Cry1Ac 毒力的影响。结果表明: 注射 dsRNA (1 $\mu\text{g}/\text{头}$) 进行基因沉默后, *Haapn1* mRNA 表达量比注射缓冲液 (elution solution, ES) 的对照下降了 30% ~ 49%, *Ha_BtR* mRNA 表达量下降了 30% ~ 37%。注射 *Haapn1* dsRNA 的幼虫在 40 和 70 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Cry1Ac 活化毒素下的死亡率显著低于注射 ES 的幼虫, 而在 100 和 170 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Cry1Ac 原毒素处理下两者死亡率无显著差异; Cry1Ac 活化毒素以及原毒素对注射 *Ha_BtR* dsRNA 幼虫与注射 ES 幼虫的毒力均无显著差异。当同时注射 *Haapn1* 及 *Ha_BtR* dsRNA 后, 干扰后的幼虫对 Cry1Ac 活化毒素和原毒素的敏感性均显著下降。本研究进一步证明了棉铃虫 *Haapn1* 和 *Ha_BtR* 均是 Bt 毒素 Cry1Ac 的功能受体, 这两种受体蛋白共同参与 Cry1Ac 的毒杀作用过程。该结果也提示, *Haapn1* 或 *Ha_BtR* 基因产生突变都可能导致棉铃虫对 Cry1Ac 产生抗性。

关键词: 棉铃虫; Bt 毒素受体; 原毒素; RNA 干扰; 基因沉默; 氨肽酶 N; 钙粘蛋白

中图分类号: Q965.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2010)10-1097-07

Effects of RNAi-mediated silencing of an aminopeptidase N gene *Haapn1* and a cadherin gene *Ha_BtR* on Cry1Ac toxicity against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae)

ZHOU Hui-Dan, YANG Yi-Hua, WU Yi-Dong* (Key Laboratory of Monitoring and Management of Crop Diseases and Pest Insects of the Ministry of Agriculture, College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Aminopeptidase N (APN) and cadherin are key receptors of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins in brush border membrane vesicles (BBMVs) of lepidopteran insects. Effects of RNAi-mediated silencing of an APN gene *Haapn1* and a cadherin gene *Ha_BtR* on Cry1Ac toxicity were investigated by injecting dsRNAs of these two genes into the 4th instar larvae of *Helicoverpa armigera* in this experiment. Reduction of mRNA expression of *Haapn1* (30% – 49%) and *Ha_BtR* (30% – 37%) was observed in the larvae injected respectively with *Haapn1* dsRNA and *Ha_BtR* dsRNA (1 $\mu\text{g}/\text{larva}$) compared with the control larvae injected with elution solution (ES) only. Mortality of larvae injected with *Haapn1* dsRNA was significantly lower than that of the control larvae injected with ES in treatments of 40 and 70 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ of activated Cry1Ac, but there was no difference in mortality of larvae injected with either *Haapn1* dsRNA or ES in treatments of 100 and 170 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ of Cry1Ac protoxin. RNAi-mediated gene silencing by injecting *Ha_BtR* dsRNA had no effect on toxicity of both activated Cry1Ac and Cry1Ac protoxin. However, toxicity of both activated Cry1Ac and Cry1Ac protoxin against the 4th instar larvae injected with a mixture of *Haapn1* dsRNA and *Ha_BtR* dsRNA was significantly reduced. These results further confirm that both *Haapn1* and *Ha_BtR* are functional receptors of Cry1Ac in *H. armigera*, and both of them are involved in intoxication of Cry1Ac. Our results also suggest that mutations occurring in either *Haapn1* or *Ha_BtR* may result in resistance to Cry1Ac in *H. armigera*.

Key words: *Helicoverpa armigera*; Bt toxin receptor; protoxin; RNAi; gene silencing; aminopeptidase N; cadherin

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30870343)

作者简介: 周慧丹, 女, 1985 年生, 硕士研究生, 研究方向为昆虫分子毒理学, E-mail: zhouhuidan@gmail.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: wyd@njau.edu.cn

收稿日期 Received: 2010-04-08; 接受日期 Accepted: 2010-06-20

苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis* 是一种革兰氏阳性细菌,在其产生孢子的过程中有伴孢晶体的形成,这些晶体对一些昆虫有杀虫作用,称之为杀虫晶体蛋白(insecticidal crystal proteins, ICPs),即 Bt 毒素。当昆虫取食杀虫晶体后,原毒素在昆虫中肠碱性条件下经蛋白酶水解为约 60 kDa 的活化毒素,进而和昆虫中肠刷状缘膜囊(brush border membrane vesicles, BBMV)上的受体互作,并在中肠细胞膜上形成穿孔,引起离子渗漏,导致细胞膨胀解体,最后死亡(Bravo *et al.*, 2007)。

氨肽酶 N(APN)和钙粘蛋白(cadherin)是 Bt 毒素 Cry1A 的受体蛋白(Bravo *et al.*, 2007)。在烟草天蛾 *Manduca sexta* 等多种鳞翅目昆虫中证实 APN 是 Bt 毒素的功能受体(Knight *et al.*, 1994; Vadlamudi *et al.*, 1995)。APN 表达量下降或基因缺失突变可以导致昆虫对 Bt 产生抗性(Rajagopal *et al.*, 2002; Herrero *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2009)。同样,也在多种鳞翅目昆虫中证实钙粘蛋白是 Bt 毒素的功能受体。已在 3 种棉花害虫:烟芽夜蛾 *Heliothis virescens*、棉红铃虫 *Pectinophora gossypiella* 和棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 中发现钙粘蛋白基因突变可以导致对 Bt 毒素 Cry1Ac 产生高水平抗性(Gahan *et al.*, 2001; Morin *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2005)。

棉铃虫 *H. armigera* 是世界性的农业害虫,其对化学杀虫剂产生抗性的问题曾严重制约了我国的棉花生产。自 1996 年 Bt 棉花商业化种植以来,我国棉铃虫得到了有效控制(Wu *et al.*, 2008)。Bt 棉花在整个生长期都表达 Bt 毒素(Cry1Ac),使棉铃虫处于持续的选择压力下,并且经室内筛选已得到对 Cry1Ac 具有高水平抗性的多个棉铃虫品系(Akhurst *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2005; Rajagopal *et al.*, 2009),表明棉铃虫对 Bt 棉花具有潜在的抗性风险。

棉铃虫 Cry1Ac 抗性品系 GYBT 的钙粘蛋白基因 *Ha_BtR* 由于缺失突变导致终止密码子提前(*r1*),产生截短的钙粘蛋白使 Bt 毒素丧失结合部位,从而对 Cry1Ac 产生抗性(Xu *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2006)。Yang 等(2007)通过 F_1 筛查法,成功地从河南安阳田间种群中捕获可导致 Cry1Ac 抗性的钙粘蛋白基因的 2 个新突变型(*r2*, *r3*),这 2 个新突变均由逆转录转座子插入而产生。Zhao 等(2010)从江苏江浦棉铃虫田间种群中分离到 5 种与 Cry1Ac 抗性相关的钙粘蛋白突变型(*r4* - *r8*)。上述研究表明棉铃虫幼虫中肠钙粘蛋白是 Bt 毒素 Cry1Ac 重要靶标受体之一, *Ha_BtR* 的功能丧失性

突变能够导致对 Cry1Ac 的高水平抗性。在棉铃虫对 Cry1Ac 的其他抗性品系中,存在不同的抗性机理。棉铃虫氨肽酶 N 基因 *Haapn1* 表达下调或突变也可以使棉铃虫产生抗性(Sivakumar *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2009),但是在田间种群中还未发现类似的基因突变。Rajagopal 等(2009)发现棉铃虫抗性品系的一种蛋白酶基因 *HaSP2* 表达丧失,使原毒素不能正常活化,从而对原毒素产生抗性,而该抗性品系对活化毒素没有抗性。

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是由双链 RNA 引起的转录后沉默机制(Fire *et al.*, 1998; Zamore *et al.*, 2000),由于其具有特异性,能够高效率地抑制基因表达, RNAi 已成为研究基因功能的重要工具。目前已在烟草天蛾(Soberón *et al.*, 2007)、棉铃虫(Sivakumar *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2009)、斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* (Rajagopal *et al.*, 2002)等鳞翅目昆虫中应用 RNAi 研究 Bt 受体基因的功能。本研究通过注射 dsRNA 的方法干扰棉铃虫 *Haapn1* 和 *Ha_BtR* 基因的表达,测定单个基因被沉默或两个基因同时被沉默后对 Cry1Ac 活化毒素和原毒素毒力的影响,以期探明棉铃虫 *Haapn1* 和 *Ha_BtR* 这两个受体在 Bt 毒素 Cry1Ac 毒杀过程中的相互作用,有助于对 Bt 毒素作用机理和抗性机理进行更全面的认识。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

敏感棉铃虫种群(SCD)已在室内饲养多年,饲养期间未接触任何杀虫剂。棉铃虫幼虫采用以麦胚粉和大豆粉为主要成分的人工饲料饲养,温度 $27 \pm 1^\circ\text{C}$,光照周期 16L:8D,成虫饲以 10% 糖水以补充营养(Yang *et al.*, 2009)。

1.2 主要试剂

Cry1Ac 原毒素由苏云金芽孢杆菌库斯塔克亚种 HD-73 菌株制备,用胰蛋白酶对原毒素进行活化制备活化毒素。SV Total RNA Isolation System 和 RT-PCR 第一链合成试剂盒购自 Promega 公司; MEGAscript RNAi Kit 购自 Ambion 公司; SYBR Green Realtime PCR Premix 购自 TaKaRa 公司。

1.3 *Haapn1* 和 *Ha_BtR* 基因片段的克隆以及 dsRNA 合成

采用 SV Total RNA Isolation System 试剂盒(Promega 公司)提取单头 5 龄幼虫中肠总 RNA,在 PCR 管中加入 2 μg 总 RNA、2 μL oligo(dT)₁₅ 引物

和 M-MLV 逆转录酶 (Promega 公司) 合成 cDNA 第一链。根据已有的棉铃虫 *Haapn1* (GenBank 登录号为 AF521659) 和 *Ha_BtR* (GenBank 登录号为 AY647974) 全长 cDNA 序列设计特异性引物 (表 1)。将扩增的 *Haapn1* 和 *Ha_BtR* 片段 (经克隆、测序验证) 作为模板, 采用 MEGAscript RNAi Kit 分别

转录得到正义 RNA 和反义 RNA, 将互补的正义 RNA 和反义 RNA 混合, 75℃ 孵育 5min, 冷却至室温, 在冷却过程中退火形成 dsRNA, 用 DNase I 和 RNase 消化模板中的 DNA 以及 ssRNA, 最后纯化得到 dsRNA, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 dsRNA 质量后, -70℃ 保存备用。

表 1 合成 *Haapn1* 和 *Ha_BtR* dsRNA 所用的引物
Table 1 Primers used for *Haapn1* and *Ha_BtR* dsRNA production

基因 Gene	引物 Primer	序列 (5' - 3') Sequence	产物长度 (bp) Product length
<i>Haapn1</i>	apn1 F17	<u>TTAATACGACTCACTATAGGGAGAG</u> CTTAGCTCGAGCTGGCATT	585
	apn1 R	TGTGGTCTTGAGGCCGAGTCAT	
	apn1 F	CTTAGCTCGAGCTGGCATT	585
	apn1 RT7	<u>TTAATACGACTCACTATAGGGAGA</u> TGTGGTCTTGAGGCCGAGTCAT	
<i>Ha_BtR</i>	BtRFT7	<u>TTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCATCACTTACACTCTG</u>	558
	BtRR	CGTCTCGCCCGTGAACAGG	
	BtRF	CCCATCACTTACACTCTG	558
	BtRRT7	<u>TTAATACGACTCACTATAGGGAGAC</u> CGTCTCGCCCGTGAACAGG	

下划线部分为 T7 启动子序列。T7 promoter sequences were underlined.

1.4 dsRNA 注射剂量的确定

选择同一批棉铃虫 4 龄幼虫 (体重为 100 ± 20 mg), 用 50 μ L 微量进样器从幼虫背面将 dsRNA 或稀释缓冲液 (elution solution, ES) 注入幼虫体内。分别将 1, 3, 6 和 12 μ g 目标基因 dsRNA (体积均为 6 μ L) 注射 4 龄幼虫各 10 头, 对照注射同体积 ES (10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.0, 1 mmol/L EDTA), 48 h 后制备中肠总 RNA (每个剂量取 5 头), 用于检测 RNA 干扰效率, 以确定最佳注射剂量。

1.5 RNAi 基因沉默效率检测

注射 dsRNA 以及 ES 48 h 后提取单头 4 龄幼虫的中肠总 RNA, 反转录合成单链 cDNA, 用于定量

PCR。分别为 *Haapn1*、*Ha_BtR* 和一个持家基因——延伸因子 1 α (*EF-1 α*) 设计了一对特异性引物 (表 2)。20 μ L 反应体系包含: 10 μ L SYBR Premix Ex Taq ($2 \times$), 上游引物、下游引物以及 ROX Reference ($50 \times$) 各 0.4 μ L, DNA 模板 2 μ L 和 ddH₂O 6.8 μ L。用 ABI 7300 型荧光定量 PCR 仪 (Applied Biosystems) 完成定量 PCR。采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法 (Livak and Schmittgen, 2001) 计算 mRNA 相对表达量。

1.6 生物测定

采用毒素涂表法进行生物测定 (Xu *et al.*, 2005)。将 Cry1Ac 毒素用磷酸缓冲液 (PBS 0.01 mol/L, pH 7.4) 稀释成一定的浓度, PBS 作为

表 2 定量 PCR 所用引物以及目标基因 GenBank 登录号
Table 2 Primers used for realtime PCR and the GenBank accession numbers of the target genes

基因 Gene	引物 Primer	序列 (5' - 3') Sequence	GenBank 登录号 GenBank accession no.
<i>Haapn1</i>	apn1 F	CTTAGCTCGAGCTGGCATT	AF521659
	apn1 R	CCGATGTCACAAAGGAAAGTCA	
<i>Cadherin</i>	C1 F	AATCTGCTGACTGTAGTAGGACAC	AY647974
	C1 R	GGCAGTTTCTCTCCTTGAATCAG	
<i>EF-1α</i>	EF-F	GACAAACGTACCATCGAGAAG	U20129
	EF-R1	GATACCAGCCTCGAACTCAC	

对照。在 24 孔板的每个孔(直径 1.6 cm)中注入 800 μL 棉铃虫饲料,注入时保持饲料表面平整,待饲料凝固后,在其表面加入 100 μL 不同浓度毒素溶液,常温晾干。在 24 孔板每孔内接入 1 头经注射处理的 4 龄幼虫(每个剂量 60 头幼虫),盖上黑布以及盖子,置于温度 $26 \pm 1^\circ\text{C}$,相对湿度 60%,光周期 16L:8D 的环境下饲养,5 d 后记录实验结果。

测定 Cry1Ac 原毒素和活化毒素的毒力回归线时,将饥饿了 48 h 的 4 龄幼虫(100 ± 20 mg)接入涂有毒素的 24 孔板内,Cry1Ac 活化毒素的剂量范围从 20 ~ 140 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$,Cry1Ac 原毒素的剂量范围从 60 ~ 460 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$,每个剂量测定 48 头幼虫,喂食毒素 5 d 后记录生测结果,用死亡机率值法计算毒力回归线。

1.7 数据分析与统计

采用 POLO-PC 软件计算 Cry1Ac 活化毒素以及原毒素 LC_{50} (LeOra Software, 1987)。死亡率差异的显著性用 DPS 数据处理系统 3.1.0.1 进行处理(唐启义和冯明光, 2007),采用 Student's *t* 检验方法进行分析。

2 结果与分析

2.1 dsRNA 注射剂量的确定

在棉铃虫 4 龄幼虫体内注射 6 μL 不同剂量的 dsRNA(1, 3, 6 和 12 μg),注射 ES 作为对照。48 h 后提取其中肠总 RNA,并检测 mRNA 表达量。注射 1 μg *Haapn1* dsRNA 后,*Haapn1* 基因表达量降为 49%,效果最佳;注射 6 μg 和 12 μg 后,*Haapn1* 表达量降至 50% ~ 60% 之间(图 1:A)。注射不同剂量的 *Ha_BtR* dsRNA 后,*Ha_BtR* mRNA 表达量均降为 70% 左右(图 1:B)。因此,均选用 1 μg dsRNA 作为 2 个基因的注射剂量进行后续 RNAi 研究。

2.2 Cry1Ac 活化毒素和原毒素对棉铃虫 4 龄幼虫

毒力测定结果表明,Cry1Ac 活化毒素对棉铃虫 4 龄幼虫的 LC_{50} 为 30.4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (95% 置信限: 23 ~ 42 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$),Cry1Ac 原毒素的 LC_{50} 为 75.6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (95% 置信限: 63.4 ~ 88.2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)。由于进行 dsRNA 注射处理的虫量有限,不能进行毒力回归线的测定。因此,分别选取两个剂量的 Cry1Ac 活化毒素(40 和 70 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)和 Cry1Ac 原毒素(100 和 170 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)进行 RNAi 后的毒力测定。

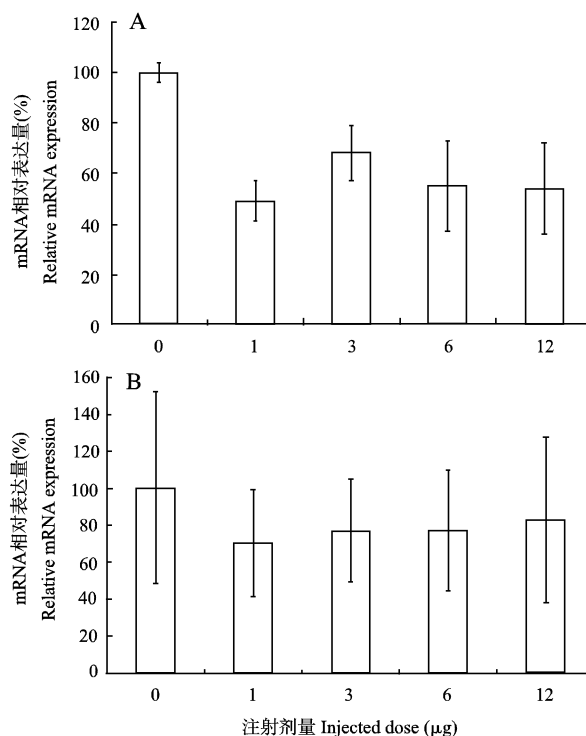


图 1 分别注射不同剂量 *Haapn1* (A) 和 *Ha_BtR* (B) dsRNA 对棉铃虫 4 龄幼虫的基因沉默效果
Fig. 1 Gene silencing efficacy on the 4th instar larvae of *Helicoverpa armigera* injected with a serial doses of either *Haapn1* (A) and *Ha_BtR* (B) dsRNAs

2.3 Haapn1 和 Ha_BtR 基因沉默对 Cry1Ac 毒力的影响

注射 *Haapn1* dsRNA 48 h 后, *Haapn1* 的 mRNA 表达量下降了 30%。Cry1Ac 活化毒素对注射 *Haapn1* dsRNA 幼虫的毒力显著低于注射 ES 的幼虫(图 2:A),而 Cry1Ac 原毒素对两种处理的幼虫的毒力没有显著差异(图 2:B)。

注射 *Ha_BtR* dsRNA 后, *Ha_BtR* 的 mRNA 表达量也下降了 30%。Cry1Ac 活化毒素和原毒素对注射 *Ha_BtR* dsRNA 幼虫和注射 ES 幼虫的毒力没有显著差异(除原毒素 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 第 4 天的结果)(图 3:A,B)。

当注射 *Haapn1* 和 *Ha_BtR* 混合物(各 1 μg)后,Cry1Ac 原毒素和活化毒素对注射 dsRNA 幼虫的死亡率显著低于注射 ES 对照幼虫的死亡率,尤其在第 5 天,基因沉默处理组与对照组之间死亡率的差异达到极显著(图 4:A,B)。定量 PCR 检测表明 *Haapn1* 和 *Ha_BtR* 基因表达同时被沉默,与对照相比其表达量分别下降了 46% 和 37% (图 5)。

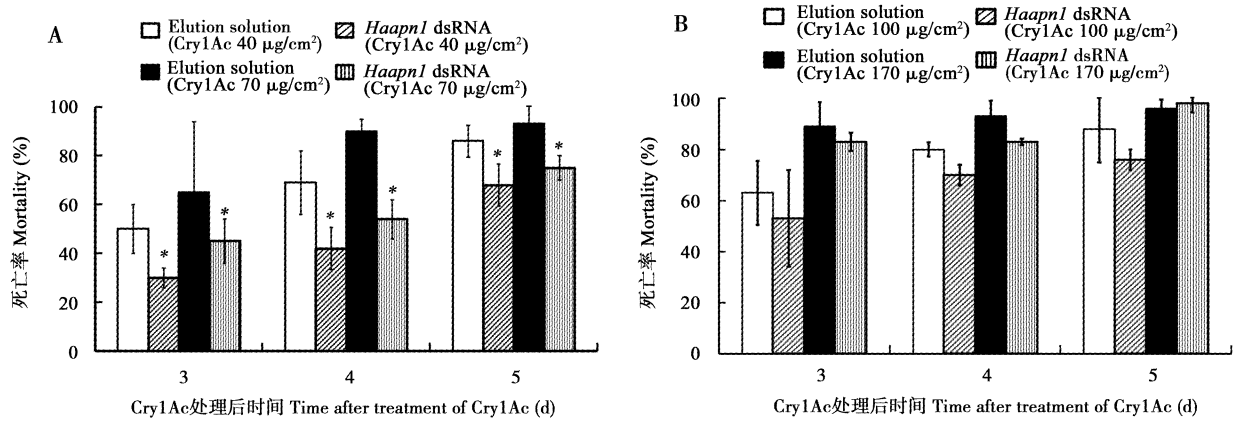


图2 棉铃虫 *Haapn1* 沉默对 Cry1Ac 活化毒素(A)和 Cry1Ac 原毒素(B)毒力的影响

Fig. 2 Effects of *Haapn1* silencing by dsRNA on toxicity of activated Cry1Ac (A) and Cry1Ac protoxin (B) in 4th instar larvae of *Helicoverpa armigera*

* 差异显著(95%) Significant difference at 95% level. 图3和4同 The same for Figs. 3 and 4.

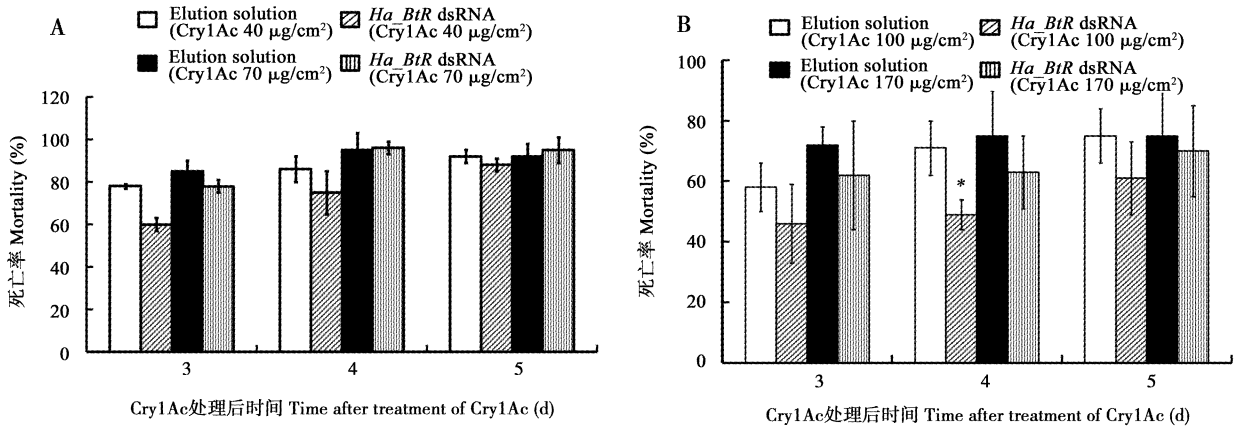


图3 棉铃虫 *Ha_BtR* 沉默对 Cry1Ac 活化毒素(A)和 Cry1Ac 原毒素(B)毒力的影响

Fig. 3 Effects of *Ha_BtR* silencing by dsRNA on toxicity of activated Cry1Ac (A) and Cry1Ac protoxin (B) in 4th instar larvae of *Helicoverpa armigera*

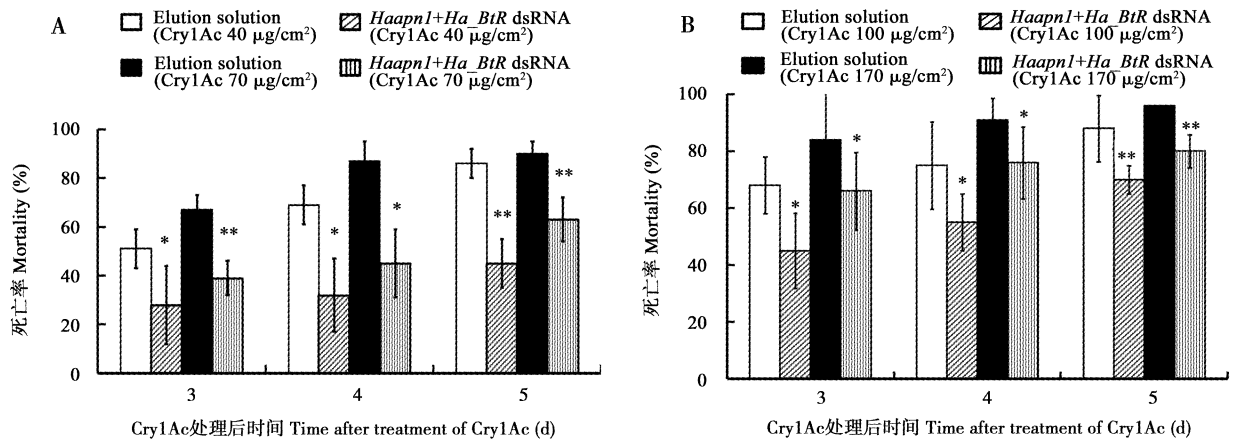


图4 棉铃虫 *Haapn1* 和 *Ha_BtR* 基因同时沉默对 Cry1Ac 活化毒素(A)和 Cry1Ac 原毒素(B)毒力的影响

Fig. 4 Effects of both *Haapn1* and *Ha_BtR* silencing by dsRNA on toxicity of activated Cry1Ac (A) and Cry1Ac protoxin (B) in 4th instar larvae of *Helicoverpa armigera*

** 差异极显著(99%) Significant difference at 99% level.

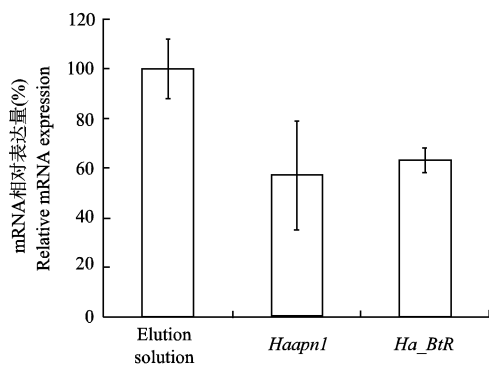


图5 同时注射 *Haapn1* 和 *Ha_BtR* 基因 dsRNA 后棉铃虫 4 龄幼虫的 mRNA 表达量

Fig. 5 *Haapn1* and *Ha_BtR* mRNA expression levels in 4th instar larvae of *Helicoverpa armigera* injected with a mixture of *Haapn1* and *Ha_BtR* dsRNAs

3 讨论

氨肽酶 N 是 Bt 杀虫蛋白的重要结合受体,其表达量与抗性有关。Gill 和 Ellar (2002) 将烟草天蛾的 APN 转入果蝇中进行活体表达,当 APN 受体在中肠组织表达时,原来对 Cry1Ac 不敏感的果蝇在 Cry1Ac 50 ng/μL 的作用下死亡;在对 Cry1Ca 有抗性的甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 中,用 Northern blot 未能检测到 APN1 的表达 (Herrero *et al.*, 2005);注射 APN dsRNA 干扰斜纹夜蛾 APN 的表达,结果降低了斜纹夜蛾对毒素 Cry1C 的敏感性 (Rajagopal *et al.*, 2002)。在本实验中,注射 *Haapn1* dsRNA 后,棉铃虫 4 龄幼虫的 *Haapn1* 表达量下降, Cry1Ac 活化毒素的作用效果与对照组幼虫比较明显下降,表明 *Haapn1* 的表达量降低后影响棉铃虫对 Cry1Ac 活化毒素的敏感性,说明 *Haapn1* 是 Bt 的作用受体;但 *Haapn1* 被干扰后,对 Cry1Ac 原毒素毒力的影响并不明显。Cry1Ac 原毒素在棉铃虫中肠活化与体外用胰蛋白酶活化存在一定差异 (吴益东, 未发表资料),该差异有可能导致基因沉默对原毒素和活化毒素敏感性的不同效应。

在 3 种鳞翅目昆虫中都发现钙粘蛋白受体的突变与 Cry1Ac 抗性有关,迄今已发现 12 种钙粘蛋白突变等位基因可导致对 Cry1Ac 抗性的产生 (Gahan *et al.*, 2001; Morin *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2005; Soberón *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2010)。Xu 等 (2005) 用 Cry1Ac 活化毒素筛选得到有 564 倍抗性的品系 (GYBT),其 *Ha_BtR* 在第 1 285 位变异产生一个提前终止的密码子 TAA,仅编码 428 个氨基酸残基。Yang 等 (2009) 用 GYBT 和 SCD 敏感品系杂交、回交数代后得到一个 *Ha_*

BtR 缺失突变近等基因系 SCD-r1,其抗性基因是完全隐性的。SCD-r1 品系对 Cry1Ac 有 438 倍的抗性,其与 SCD 杂交后代 (F_1) 对 Cry1Ac 完全敏感,即在 *Ha_BtR* 基因表达量降低 50% 的情况下, Cry1Ac 毒素仍能正常发挥毒杀作用。在本实验中,当 *Ha_BtR* 基因表达下降 30% 左右后,对 Cry1Ac 原毒素及活化毒素的作用效果无显著影响。据此推测, *Ha_BtR* 基因在完全不表达或表达量很低时,才可能对 Cry1Ac 的毒力产生明显效果。

在烟草天蛾中,氨肽酶 N 和钙粘蛋白是 Cry1A 毒素不可缺少的受体 (Bravo *et al.*, 2004),活化毒素单体与钙粘蛋白结合,切除 α -1 螺旋后形成寡聚体,寡聚体与氨肽酶 N 或碱性磷酸酯酶结合 (Gómez *et al.*, 2002; Jurat-Fuentes and Adang, 2006),然后在细胞膜脂筏处形成穿孔 (Pardo-López *et al.*, 2006)。在本实验中,当 *Haapn1* 和 *Ha_BtR* 同时干扰后,活化毒素和原毒素处理的死亡率显著低于对照,其差异大于 *Haapn1* 和 *Ha_BtR* 分别干扰后死亡率的差异,说明 *Haapn1* 和 *Ha_BtR* 两个受体都与毒素的作用有关,而且在这两个受体的相互作用下,毒素能更好地发挥其毒力。本研究的实验结果支持 Bravo 等 (2007) 描述的毒素穿孔模型。

在棉铃虫中,已用 RNAi 证明了 *Haapn1* 是 Cry1Ac 的受体 (Sivakumar *et al.*, 2007)。而在本实验中同时干扰了 *Haapn1* 和 *Ha_BtR*,进一步证明了棉铃虫 *Haapn1* 和 *Ha_BtR* 均是 Bt 毒素 Cry1Ac 的功能受体,这两种受体蛋白共同参与 Cry1Ac 的毒杀作用过程。该结果也表明, *Haapn1* 或 *Ha_BtR* 基因产生突变均可能导致棉铃虫对 Cry1Ac 产生抗性。

现已在棉铃虫中发现 7 种氨肽酶 N (Angelucci *et al.*, 2008),除 *Haapn1* 外的其他几种氨肽酶 N 与 Cry1Ac 的关系尚未清楚。棉铃虫多个氨肽酶 N 和钙粘蛋白在毒素作用过程中的相互作用以及与抗性产生的关系,尚有待进一步研究。

参考文献 (References)

- Akhurst RJ, James W, Bird LJ, Beard C, 2003. Resistance to the CryAc δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.*, 96: 1290–1299.
- Angelucci C, Barrett-Wilt GA, Hunt DF, Akhurst RJ, East PD, Gordon KHJ, Campbell PM, 2008. Diversity of aminopeptidases, derived from four lepidopteran gene duplications, and polycalins expressed in the midgut of *Helicoverpa armigera*: identification of proteins binding the δ -endotoxin, Cry1Ac of *Bacillus thuringiensis*. *Insect*

- Biochem. Mol. Biol.*, 38: 685–696.
- Bravo A, Gill SS, Soberón M, 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 49: 423–435.
- Bravo A, Gómez I, Conde J, Muñoz-Garay C, Sánchez J, Miranda R, Zhuang M, Gill SS, Soberón M, 2004. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochim. Biophys. Acta*, 1667: 38–46.
- Fire A, Xu SQ, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC, 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391: 806–811.
- Gahan LJ, Gould F, Heckel DG, 2001. Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. *Science*, 293: 857–860.
- Gill M, Ellar D, 2002. Transgenic *Drosophila* reveals a functional *in vivo* receptor for the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac1. *Insect Mol. Biol.*, 11: 619–625.
- Gómez I, Sánchez J, Miranda R, Bravo A, Soberón M, 2002. Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix α -1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *FEBS Lett.*, 513: 242–246.
- Herrero S, Gechev T, Bakker PL, Moar WJ, de Maagd RA, 2005. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca-resistant *Spodoptera exigua* lacks expression of one of four aminopeptidase N genes. *BMC Genomics*, 6: 96–106.
- Jurat-Fuentes JL, Adang MJ, 2006. Cry toxin mode of action in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *J. Invertebr. Pathol.*, 92: 166–171.
- Knight PJ, Crickmore N, Ellar DJ, 1994. The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA (c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. *Mol. Microbiol.*, 11: 429–436.
- Kumar M, Gupta GP, Rajam V, 2009. Silencing of acetylcholinesterase gene of *Helicoverpa armigera* by siRNA affects larval growth and its life cycle. *J. Insect Physiol.*, 55: 273–278.
- LeOra Software, 1987. Polo-PC: A User's Guide to Probit or Logit Analysis. LeOra Software, Berkeley, CA.
- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, 25: 402–408.
- Morin S, Biggs RW, Sisterson MS, Shriver L, Ellers-Kirk C, Higginson D, Holley D, Gahan LJ, Heckel DG, Carriere Y, Dennehy TJ, Brown JK, Tabashnik BE, 2003. Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100: 5004–5009.
- Pardo-López L, Gómez I, Rausell C, Sánchez J, Soberón M, Bravo A, 2006. Structural changes of the Cry1Ac oligomeric pre-pore from *Bacillus thuringiensis* induced by N-acetylgalactosamine facilitates toxin membrane insertion. *Biochemistry*, 45: 10329–10336.
- Rajagopal R, Arora N, Sivakumar S, Rao NG, Nimbalkar SA, Bhatnagar RK, 2009. Resistance of *Helicoverpa armigera* to Cry1Ac toxin from *Bacillus thuringiensis* is due to improper processing of the protoxin. *Biochem. J.*, 419: 309–316.
- Rajagopal R, Sivakumar S, Agrawal N, Malhotra P, Bhatnagar RK, 2002. Silencing of midgut aminopeptidase N of *Spodoptera litura* by double-stranded RNA establishes its role as *Bacillus thuringiensis* toxin receptor. *J. Biol. Chem.*, 277: 46849–46851.
- Sivakumar S, Rajagopal R, Venkatesh GR, Srivastava A, Bhatnagar RK, 2007. Knockdown of aminopeptidase-N from *Helicoverpa armigera* larvae and in transfected Sf21 cells by RNA interference reveals its functional interaction with *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein Cry1Ac. *J. Biol. Chem.*, 282: 7312–7319.
- Soberón M, Pardo-López L, López I, Gómez I, Tabashnik BE, Bravo A, 2007. Engineering modified Bt toxins to counter insect resistance. *Science*, 318: 1640–1642.
- Tang QY, Feng MG, 2007. DPS Data Processing System – Experimental Design, Statistical Analysis and Data Mining. Science Press, Beijing. 69–71. [唐启义, 冯明光, 2007. DPS 数据处理系统——实验设计、统计分析及数据挖掘. 北京: 科学出版社. 69–71]
- Vadlamudi RK, Weber E, Ji I, Ji TH, Bulla LA Jr, 1995. Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.*, 270: 5490–5494.
- Wu KM, Lu YH, Feng HQ, Jiang YY, Zhao JZ, 2008. Suppression of cotton bollworm in multiple crops in China in areas with Bt toxin-containing cotton. *Science*, 321: 1676–1678.
- Xu XJ, Yu LY, Wu YD, 2005. Disruption of a cadherin gene associated with resistance to Cry1Ac δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armigera*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 948–954.
- Yang YH, Yang YJ, Gao WY, Guo JJ, Wu YH, Wu YD, 2009. Introgression of a disrupted cadherin gene enables susceptible *Helicoverpa armigera* to obtain resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac. *Bull. Entomol. Res.*, 99: 175–181.
- Yang YJ, Chen HY, Wu SW, Yang YH, Xu XJ, Wu YD, 2006. Identification and molecular detection of a deletion mutation responsible for a truncated cadherin of *Helicoverpa armigera*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 36: 735–740.
- Yang YJ, Chen HY, Wu YD, Yang YH, Wu SW, 2007. Mutated cadherin alleles from a field population of *Helicoverpa armigera* confer resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73: 6939–6944.
- Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP, 2000. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, 101: 25–33.
- Zhang SP, Cheng HM, Gao YL, Wang GR, Liang GM, Wu KM, 2009. Mutation of an aminopeptidase N gene is associated with *Helicoverpa armigera* resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 39: 421–429.
- Zhao J, Jin L, Yang YH, Wu YD, 2010. Diverse cadherin mutations conferring resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in *Helicoverpa armigera*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 40: 113–118.

(责任编辑: 赵利辉)